

Trabajo Fin de Grado

UTILIZACIÓN DE CRISPR EN LA INHIBICIÓN DEL GEN
DE LA MIOSTATINA (MSTN)

USE OF CRISPR IN THE INHIBITION OF
THE MYOSTATIN GENE (MSTN)

Autor

Eduardo Morella Barreda

Directores

Pedro Muniesa Lorda

María Climent Aroz

Facultad de Veterinaria

Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal.

2021

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	2
1.1 ABSTRACT.....	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. <i>Miostatina</i>	4
2.2. <i>Fenotipos de musculación doble</i>	6
2.3. <i>Ingeniería genética animal</i>	7
2.4. <i>Técnicas de ingeniería genética en animales domésticos</i>	8
2.5. <i>Aplicaciones generales de la ingeniería genética en animales domésticos</i>	12
2.6. <i>Regulación europea de productos transgénicos destinados a consumo humano.</i>	13
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	14
4. METODOLOGÍA.....	15
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
5.1. <i>Origen de los sistemas CRISPR</i>	15
5.2. <i>Fundamentos de CRISPR</i>	18
5.3. <i>CRISPR y modificación de la miostatina (MSTN)</i>	19
6. CONCLUSIONES	23
6.1. <i>CONCLUSIONS</i>	23
7. VALORACIÓN PERSONAL	24
8. BIBLIOGRAFÍA	25
9. ANEXO.....	33

1. RESUMEN

Uno de los desafíos actuales de la sociedad es hacer frente a la creciente demografía y lo que supone en diferentes aspectos como contaminación, deforestación o las complicaciones para el abastecimiento de alimentos ante una incrementada demanda. Por ello, y en la búsqueda de soluciones, se comenzó a emplear la ingeniería genética -que consiste en la modificación de secuencias genómicas de ADN empleando biología molecular- en diferentes ámbitos como la modificación del perfil nutricional, conservación del medio ambiente u obtención de organismos genéticamente modificados.

Existen diversas técnicas de ingeniería genética (inyección pronuclear, transferencia nuclear...), pero la más destacable y con mayores perspectivas a futuro es CRISPR, cuyas siglas se traducen como “Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas” en una misma región del genoma. Lo que destaca de esta técnica es la posibilidad de seleccionar de manera específica regiones del ADN (lo cual le da mayor eficiencia) haciendo uso de una endonucleasa llamada “Cas9” que produce el corte del ADN, como si se tratase de unas “tijeras moleculares”.

Uno de los campos de investigación que más se han beneficiado de esta técnica es el estudio del aumento de la masa muscular en diferentes especies domésticas. La inhibición de la miostatina, una proteína esencial que actúa como regulador negativo del crecimiento muscular, posibilita aumentar el rendimiento de la canal. No obstante, el consumidor general, se muestra reticente a los productos generados mediante ingeniería genética y el desarrollo, producción y posible admisión para consumo de animales cuyo genoma ha sido editado mediante CRISPR, se ve afectada por la legislación en distintos países y su consideración, o no, como organismos modificados genéticamente (OMG).

1.1 ABSTRACT

One of the current challenges of society, is to face the growing demography and its consequences in pollution, deforestation or complications in food supply because of an increasing demand. Therefore, and searching for a solution, genetic engineering -which is the modification of genomic DNA sequences using molecular biology- was used in different areas such as the modification of the nutritional profile, conservation of the environment and obtaining genetically modified organism.

There are different genetic engineering techniques (pronuclear injection, nuclear transfer...), but the most remarkable and the one with the greatest future prospect is CRISPR, “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats” in the same region of genoma. The most outstanding feature about this technique is the possibility of specifically selecting DNA regions (giving it greater efficiency) using an endonuclease called “Cas9” that cuts DNA, as “molecular scissors” would do.

The increased of muscle mass in different domestic species is one the most benefitted research fields by using this technique. By inhibiting myostatin, an essential protein that acts as a negative regulator of muscle growth, we can obtain an increase the carcass yield. However, some consumers are reluctant to products generated by genetic engineering, and the development, production and possible admission for consumption of animals whose genome has been edited through CRISPR, is affected by the legislation in different countries and their consideration, or not, as genetically modified organisms (GMOs).

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Miostatina

La miostatina (MSTN), o GDF-8 (factor de diferenciación de crecimiento 8), codificada por el gen *Mstn* (MSTN en humanos) es una proteína esencial para la regulación adecuada de la masa de músculo esquelético en diversas especies de mamíferos. Forma parte de la superfamilia de factores de crecimiento del TGF β , constituida por un gran número de factores de crecimiento y diferenciación, la cual tiene un papel muy importante en la regulación del desarrollo y la homeostasis de los tejidos (Morikawa et al, 2016). Diferentes experimentos en ratón determinaron su actuación como regulador negativo, puesto que los ratones que no tenían miostatina, experimentaban un crecimiento muy notable en la masa de músculo esquelético, llegando incluso a aumentar el peso hasta 2 o 3 veces más que el músculo de ratones salvajes (McPherron et al, 1997). Con dichos resultados, y persiguiendo potenciales usos agrícolas y biotecnológicos, se han llevado a cabo estudios en distintas especies. Se han podido observar mutaciones en perros, ovejas, cerdos, terneros e incluso humanos (Aiello et al, 2018).

El gen de la miostatina se expresa en numerosos tejidos (incluyendo la glándula mamaria), pero sobretodo en el músculo esquelético. Dicho gen se ha ido conservando a lo largo de la evolución y comprende tres exones y dos intrones. No obstante, para ejercer su efecto la proteína precursora de 375 aminoácidos, codificada por los exones de la miostatina, debe sufrir un procesado postraducciona (Figura 1) para activarse biológicamente (Wolfman et al, 2013):

1. Los polipéptidos sufren una homodimerización intracelular por medio de la formación de enlaces disulfuro.
2. La dimerización mediante un enlace disulfuro permite formar el dímero a partir del cual se obtienen la región **N-terminal** y la región **C-terminal madura**.
3. La proteína de 12-kDa C-terminal inicia una cascada de señalización intracelular mediante su capacidad para unir y activar el receptor activina tipo II (ActRIIB) de la superficie celular.
4. La consecuente autofosforilación del ActRIIB produce el reclutamiento y activación del receptor de baja afinidad tipo I para activina ALK-4 o ALK-5.
5. Dicho receptor fosforila la transcripción de factores Smad2 y Smad3, permitiendo interactuar con Smad4 (co-Smad) y traslocar al núcleo para activar la transcripción del gen objetivo.

6. La activación del receptor de la miostatina también inhibe la actividad de la proteinasa B, lo cual es un determinante en la síntesis de proteína muscular y de la proliferación muscular, controlando de esta forma la hipertrofia (alargamiento de las fibras musculares).

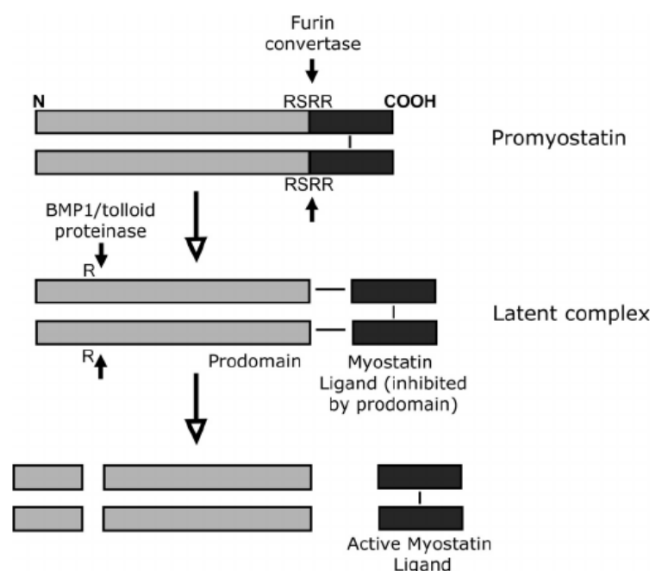


Figura 1. Representación del procesado de la miostatina. La miostatina se produce en el interior de las células como una molécula inactiva (promiostatina) que forma un homodímero unido por enlace disulfato tras la síntesis. Se adhiere al sitio RSRR (Arg-Ser-Arg-Arg) para generar la región NH₂ terminal y COOH terminal. Tras esto, el fragmento COOH terminal se mantiene unido al fragmento NH₂ terminal (predominio). Esta asociación se llama complejo latente de la miostatina. La miostatina se activará cuando el dímero COOH se separe y se una al receptor ActRIIB. (Imagen extraída de Breitbart *et al.*, 2011).

La diferenciación miogénica (Figura 2) es un programa secuencial que finalmente da lugar a músculo. Para ello, los precursores musculares hiperproliferativos que se desarrollaron durante la embriogénesis, se diferencian en mioblastos.

La miostatina regula el crecimiento muscular en determinados puntos clave durante el desarrollo muscular prenatal: proliferación de precursores musculares, proliferación de mioblastos y diferenciación. La expresión ectópica de miostatina produce el descenso de Pax3 (marcador clave de la proliferación de precursores musculares). Además, la expresión de miostatina aumenta la expresión de p21, lo que favorece la actividad de Rb (proteína retinoblastoma) limitando la proliferación de mioblastos, e inhibiendo a través de Smad2/3 la

expresión de MyoD (proteína 1 de diferenciación miogénica) que produce la diferenciación de los mioblastos en miotubos (Aiello et al, 2018).

En definitiva, la miostatina sirve para limitar el tamaño de los precursores de mioblastos y la cantidad de mioblastos. Por tanto, un descenso de la expresión de la miostatina daría lugar a la expansión de ambas poblaciones, aumentando la masa muscular (la masa muscular está definida por la capacidad de los mioblastos para formar fibras).

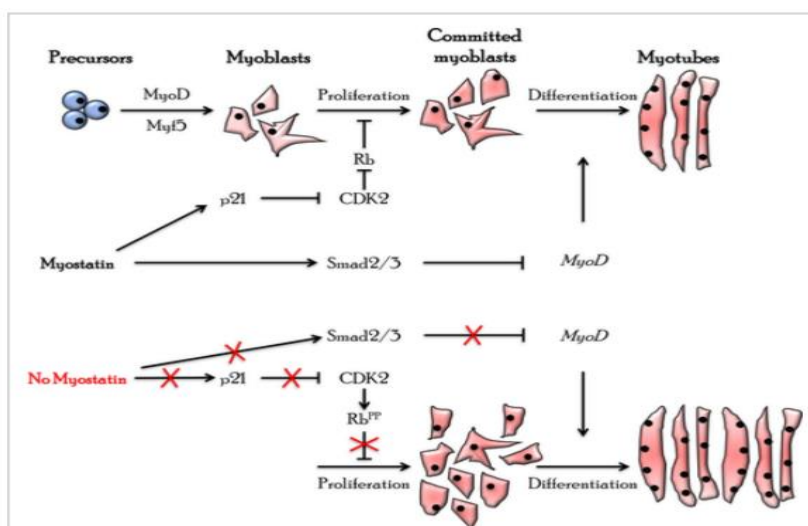


Figura 2. Acción de la miostatina durante la proliferación y diferenciación de los mioblastos. La proteína retinoblastoma (Rb), en un estado poco fosforilado, inhibe la división celular. La actividad de la Rb se reduce por la hiperfosforilación realizada por CDK2 (quinasa dependiente de ciclina 2). A su vez, la actividad de CDK2 queda inhibida por la p21, que aumenta con la acción de la MSTN. La MSTN también activa la señalización de Smad2/3, la cual inhibe la expresión de la MyoD, que es necesaria para la diferenciación de los mioblastos. (Imagen extraída de Aiello et al, 2018)

2.2. Fenotipos de musculación doble

La primera descripción de doble musculación (DBM) se definió en ganado de Blanca Azul Belga (Figura 3) en 1980 y se determinó que se debía a una mutación en el cromosoma 2 (Kambadur et al, 1997). Se demostró que la musculación doble se heredaba como un único locus autosómico que, sin embargo, presentaba penetrancia incompleta al estar afectado por distintos loci modificadores (Grobet et al, 1997).

Desde entonces se han identificado más de 20 variantes, en numerosas especies. Algunas de estas variantes son las causantes de hipertrofia causada por la inactivación del gen. La inactivación de la miostatina y variación de alelos tienen una significativa relación con la velocidad de crecimiento y los rasgos de la canal, pudiendo ser empleados para una mejora de

la cantidad y calidad. Dicho aumento de la calidad se debe a una reducción de la grasa, un incremento en la masa muscular, y una menor proporción de hueso y tejido conectivo, lo cual implica una mejora de la conformación y del rendimiento canal (Martínez et al, 2010).

No obstante, los fenotipos de doble musculación no están exentos de problemas, dado que los animales en los cuales está presente son más susceptibles a problemas nutricionales, respiratorios, urolitiasis o distocias (la gestación de terneros con DBM es más larga y el peso de nacimiento es mayor, por lo que es necesario asistir los partos), lo cual reduce su rusticidad. Dichos problemas reproductivos son observables en terneros homocigotos, por ello, se ha considerado más óptimo llevar a cabo la producción de animales heterocigotos, de forma que obtenemos las ventajas de la DBM y podemos reducir la mortalidad de los terneros. Por último, los terneros con musculación doble presentan problemas circulatorios, causando deficiencia en el transporte de oxígeno y reduciendo la actividad metabólica del músculo, lo que provoca que los terneros con musculación doble se fatiguen más (Holmes et al, 1973).



Figura 3. Blanca Azul Belga con fenotipo de doble musculación. (Imagen extraída de: Generalidades de la Ganadería Bovina. Disponible en: <http://generalidadesdelaganaderiabovina.blogspot.com/2014/01/belgian-blue-blanco-azul-belga.html>)

2.3. Ingeniería genética animal

La ingeniería genética animal consiste en la modificación de secuencias genómicas de ADN mediante el uso de la biología molecular (Lanigan et al, 2019). Esta rama de la genética se emplea en numerosos ámbitos, desde usos biomédicos a mejoras en el rendimiento de la producción agrícola.

No obstante, su uso en animales se encontraba enormemente limitado ya que, a pesar de haber logrado la inserción aleatoria de secuencias de ADN en el genoma mediante inyección en pronúcleo, no era lo suficientemente eficiente (al insertarse de forma aleatoria se obtenían resultados no deseados o esperados) y eran muy costosas tanto en tiempo como recursos (Mojica et al, 2016).

La obtención y manipulación en el ratón de células embrionarias troncales (Embryonic Stem Cells, ESC o células ES; Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981), posibilitó la obtención de animales quiméricos: al inyectar las células modificadas por recombinación homóloga en embriones de preimplantación (Bradley et al. 1984), las células con la modificación intencionada contribuyen a la formación de la descendencia. En 1989, se obtuvo el primer ratón knock-out mediante recombinación homóloga en células ES (Thompson et al. 1989). Esta técnica abría la posibilidad de realizar una ingeniería genética mucho más precisa y dirigida y se convirtió en una herramienta habitual en ingeniería genética del ratón (Capecchi, 2005). El problema es que este método era funcional exclusivamente en ratones (ver revisión en Martello et al, 2014).

Existen distintos tipos de modificaciones genéticas, pero avances como la modificación dirigida mediante recombinación homóloga en localizaciones específicas del genoma, han abierto la puerta a posibilidades como knockouts (KO), knockins (KI) y sustituciones (Lanigan et al, 2019):

- Los knockouts se pueden emplear para eliminar la expresión de un gen. Para ello, se pueden introducir deleciones, que permiten afectar a la expresión o a la función del gen al suprimir elementos de regulación o segmentos estructurales importantes para la actividad funcional del gen.
- Los knockins permiten introducir una gran variedad de elementos genéticos. Al igual que los knockouts pueden ser empleados para cambiar la función de un gen. Los knockins pueden emplearse para bloquear la función de un gen por la inserción de genes con marcadores fluorescentes como eGFP o mCherry, eliminando el gen en el punto de inserción (aunque también es posible su inserción sin eliminar el gen objetivo).
- Las sustituciones de fragmentos de ADN permiten bloquear la función de un gen y activar la función de un nuevo gen de manera simultánea. Se pueden emplear pequeñas sustituciones de nucleótidos para comprobar si una mutación causa una enfermedad concreta.

2.4. Técnicas de ingeniería genética en animales domésticos

Los primeros animales domésticos transgénicos, conejo, oveja y cerdo, se produjeron en 1985 mediante **inyección pronuclear** (Hammer, R.E. et al., 1985). Consiste en la microinyección de genes directamente en el pronúcleo de ovocitos fecundados (Figura 4). Primero se obtienen

zigotos en estado de dos pronúcleos y posteriormente por medio de un sistema de micromanipulación embrionaria se inyectan en el pronúcleo pequeños volúmenes de una solución de ADN con agujas de pequeño calibre. Tras el proceso de inyección, los embriones se transfieren a una hembra receptora. Esta técnica da lugar a la integración aleatoria de transgenes en el genoma, pero no permite modificaciones en genes concretos, dando lugar a problemas no deseados y una menor eficiencia (Gadea et al, 2010).

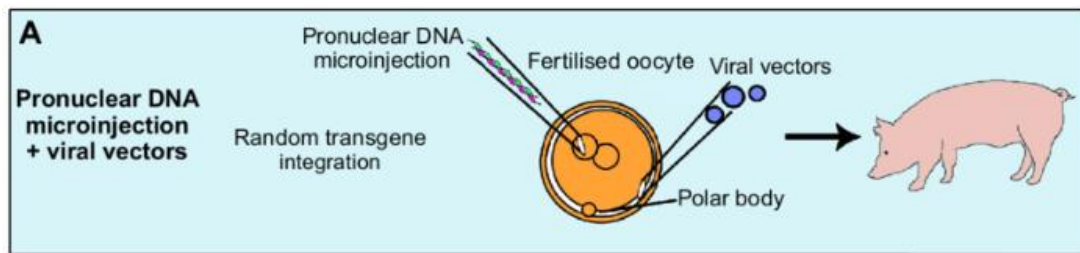


Figura 4. Representación esquemática de la técnica de inyección pronuclear. Es posible emplear vectores virales para incrementar la frecuencia de la transgénesis. (Imagen extraída de Perlerberg et al, 2018)

La **clonación mediante transferencia nuclear de células somáticas** (SCNT, de "somatic cell nuclear transfer"), fue considerada como una alternativa a la imposibilidad de obtener células ES en especies domésticas y ofrecer por tanto una ruta de modificación genética dirigida y precisa mediante recombinación homóloga. En este procedimiento, células somáticas modificadas genéticamente, actúan como donantes de núcleos que son transferidos a ovocitos enucleados, técnica con la que se creó la oveja Dolly (Wilmut et al., 1997). Para poder realizar esta técnica, se seleccionan las células somáticas sometidas a un proceso de transformación que posibilitará incluir nuevo material genético o la anulación de la expresión de un gen concreto. El problema de esta técnica reside en que los métodos de recombinación homóloga son muy poco eficaces en células somáticas y además el procedimiento de transferencia nuclear es complejo y poco eficiente (alrededor de valores entre el 1-2% de los ovocitos que se emplean), dando lugar a problemas como mortalidad perinatal y otros tipos de problemas funcionales (Yanagimachi et al, 2002).

Las anteriores técnicas hacían posible la recombinación homóloga pero el problema ha sido que, por su baja eficiencia, coste de tiempo y laboriosidad, no eran técnicas óptimas para la ingeniería genética (Petersen et al, 2017).

En los años 80, se había demostrado la existencia en levaduras de meganucleasas, proteínas como HO e I-SceI (Jacquier et al, 1985). Dichas proteínas mostraron tener propiedades endonucleolíticas que activan la recombinación homóloga en la levadura. Lo que hizo en su momento interesante el estudio de las meganucleasas para la ingeniería genética fue su capacidad de reconocer ADN específico siguiendo la identificación de un único locus del genoma de la levadura. En estudios posteriores, se determinó que tanto HO como I-SceI, reconocían secuencias de 18 pb de ADN, siendo en aquel momento la secuencia más larga que una endonucleasa podía reconocer (Kathiria et al, 2013). Hace más de 25 años, se comenzó a estudiar la posibilidad de enlazar los dominios no específicos de las endonucleasas como Fok1 a proteínas capaces de reconocer secuencias específicas de ADN, con el fin de encontrar métodos para dirigir a sitios específicos la rotura de ADN (Kim et al., 1996). Así, se inició el desarrollo de la utilización de endonucleasas como herramientas para la edición de genomas y que dió lugar al establecimiento de tres sistemas fundamentales (Figura 5):

- **ZFNs (nucleasas de dedos de zinc):** fue la primera en ser empleada, se eligió porque los dominios de dedos de zinc eran los más abundantes en las proteínas de unión de ADN. Los ZFNs consisten en dedos individuales de zinc, que constan de 30 aminoácidos de longitud en una configuración $\beta\beta\alpha$. Los aminoácidos que conforman la α -hélice interactúan con el ADN y le confieren especificidad de unión. Los ZFNs sintéticos contienen 3-6 repeticiones de esos dedos de zinc que se encuentran unidos por una secuencia conectora. Este ensamblaje de los dedos de zinc permite el reconocimiento de 9-18 bases de ADN y por medio de ingeniería se pueden emplear para la unión a secuencias específicas (Kim et al., 1997). Se han desarrollado diversos métodos para el diseño y unión de ZFNs, entre los que se incluyen el *ensamblaje modular*, sistema *OPEN* (oligomerized pool engineering) y el *sistema de ensamblaje dependiente de contexto* (Smith et al., 2000).
- **TALEN (nucleasas efectoras tipo activadores de transcripción):** se comenzó a tener constancia de su existencia en 2007. Los efectores TAL son factores de virulencia en vegetales que se producen durante la parasitación, y que se unen a secuencias de ADN concretas (sobre todo en promotores) del huésped para silenciar la transcripción de genes relacionados con la respuesta defensiva (Boch y Bonas, 2010). Los TALENs se generaron mediante la fusión del dominio de unión TAL al dominio endonucleasa de Fok1, separados por 12-25 pb. Al igual que los ZFNs, se requiere la dimerización del dominio Fok1 de dos TALENs para producir ruptura en el ADN. El dominio de unión de

ADN consiste en una formación de repeticiones en tándem, conformadas por 33-35 aminoácidos, con dos residuos variables en las posiciones 12 y 13 que determinan el reconocimiento de un nucleótido concreto. Esta variabilidad es la responsable del reconocimiento de secuencias de ADN específicas y por ello es una técnica algo más sencilla que los ZFNs (Christian et al 2010).

- **CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats):** finalmente, se comenzó a emplear el sistema CRISPR, ya que resultaba más eficaz y preciso (Gupta et al, 2019). Su funcionamiento y aplicaciones se explicará más adelante.

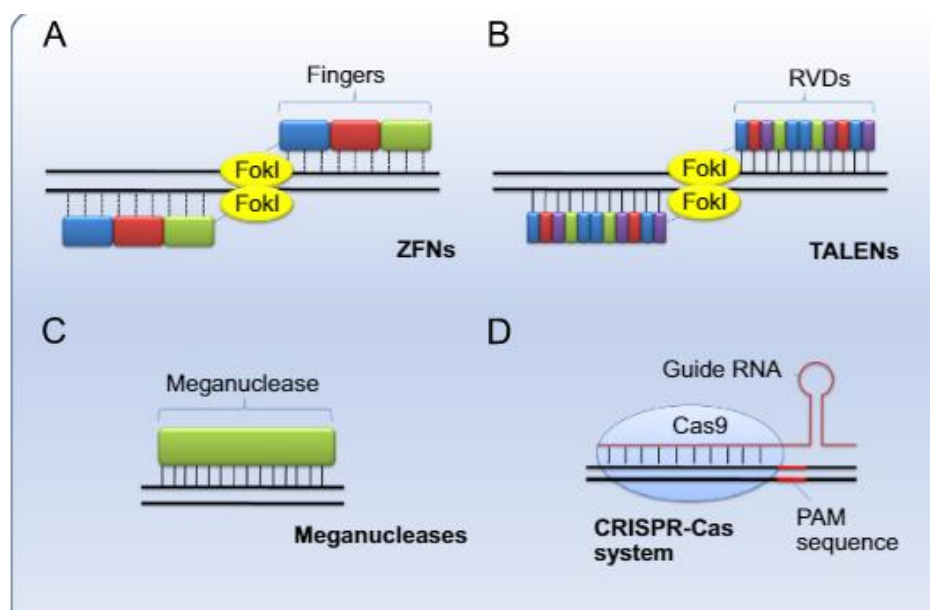


Figura 5. Distintas endonucleasas y su funcionamiento. Los ZFNs se basan en dedos de zinc, cada uno reconoce 2-3 nucleótidos. Se requieren dos repeticiones de ZFNs para la dimerización del dominio de Fok1 (A). En el caso de TALEN, para su funcionamiento se requiere de dos proteínas separadas, cada RVD (repeat variable diresidue) reconoce un nucleótido específico (B). La Meganucleasa requiere dimerización pero solo se requiere de una proteína para reconocer y cortar ADN específico. La estructura total de la Meganucleasa determina la especificidad del ADN en vez de las repeticiones (C). (Imagen extraída de Kathiria y Eudes, 2014)

2.5. Aplicaciones generales de la ingeniería genética en animales domésticos

Antes de comenzar a hablar de CRISPR, es conveniente destacar los diferentes campos en los cuales se está empleando la ingeniería genética. Estas aplicaciones son comunes a todas las técnicas, pero como se comentará posteriormente, en lo que destaca CRISPR es en su mayor eficiencia y sencillez:

- La ingeniería genética nos permite acelerar la selección de características fenotípicas, incorporando alelos deseables sin alterar ni diluir el trasfondo genético propio de la variedad o raza. Como ejemplos podemos citar el salmón AquaAdvantage, que expresa hormonas de crecimiento procedentes del salmón Chinook (Du et al, 1992), o la producción de cerdas transgénicas que expresan la α -lactalbumina bovina, lo cual aumenta la producción de leche y por ende el peso de los lechones (Bleck et al, 1998).
- Otro campo en el cual se aplica la ingeniería genética es la **modificación del perfil nutricional de productos animales** por medio de la edición genética para satisfacer la demanda de ácidos grasos insaturados. De acuerdo con esto, se consiguió un aumento de ácido linoleico en la carne por medio de la expresión de FAD2 de la espinaca (Saeki et al, 2004). La leche al tener múltiples aplicaciones (desde consumo humano a proteínas de interés terapéutico) es el producto animal con más futuro en la edición genética. De forma similar que la carne, se han obtenido cabras transgénicas que producen leche con una mayor proporción de ácidos grasos monoinsaturados (Reh et al, 2004). Además, también se han llevado a cabo modificaciones en la leche destinadas a evitar alergias o intolerancias, para ello, se han obtenido vacas que producen leche sin β -lactoglobulina (Jabed et al, 2012).
- La edición genética también nos permite **mejorar la salud animal**. En esta línea, se han generado diversos animales modificados genéticamente como terneros resistentes a la encefalopatía espongiforme bovina (Kuroiwa et al, 2004) o cerdos resistentes a la peste porcina africana (Lillico et al, 2016). Otra aproximación para la mejora de la salud animal mediante ingeniería genética es la administración de vacunas en la leche permitiendo obtener la inmunización de la descendencia (Kolb et al, 2001).
- Este tipo de técnicas también se pueden emplear para **conservar el medioambiente** al minimizar la contaminación generada por las actividades agrícolas. Por ejemplo, para

reducir la excreción de fósforo en la producción porcina, se producen cerdos que expresan fitasa proteasa resistente (procedente de *Escherichia coli*) en la glándula salivar, aportándoles la capacidad de digerir el fitato de la dieta, para no tener que necesitar suplementación con fosfato mineral o fitasa comercial, reduciendo la excreción de fósforo en un 75% (Golovan et al, 2001).

- Por último, también tiene un gran potencial para la mejora de la salud humana por medio del **desarrollo de productos biomédicos**, desde la producción de proteínas farmacéuticas a la generación de remplazos para tejidos u órganos. La creciente demanda de reemplazos de órganos podría quedar satisfecha mediante xenotransplantes de organismos genéticamente modificados (generalmente de porcino a humano). El principal problema de los xenotransplantes es el rechazo del órgano. Por ello, se han desarrollado cerdos sin epítomos o que expresan moduladores inmunes, reduciendo así la probabilidad de rechazo (Whyte et al, 2011). Con esta misma técnica es posible que las células humanas generen un órgano completo en un feto animal (tras ser inyectadas en embriones en los que se ha eliminado el gen esencial para el desarrollo del órgano concreto), constituyendo un posible procedimiento para producir órganos "humanizados" en animales (Du et al, 2017).

2.6. Regulación europea de productos transgénicos destinados a consumo humano.

Actualmente gran parte de los consumidores muestran cierto rechazo a los productos que estén relacionados de manera directa con la ingeniería genética, lo que ha llevado a la unión Europea a dedicar legislación exclusiva a los productos transgénicos o procedentes de OMG.

Tal y como establece la **Directiva (UE) 2015/412 y la Directiva 2001/18/Ce**, antes de proceder a la comercialización, los OMG deben ser sometidos a una evaluación individual. Una vez autorizado (tras demostrar que no supone efectos negativos para el ser humano, animal o medioambiente en el caso de ser liberados; que se diferencie de los alimentos que están destinados a sustituir; y que no induzca error al consumidor), los Estados Miembros no están autorizados a prohibir, restringir o impedir la comercialización en su territorio salvo en condiciones determinadas.

En el caso de España, la **Ley 9/2003** regula las actividades con OMG y establecen la utilización confinada, liberación voluntaria y la comercialización de organismos modificados genéticamente.

En lo que respecta a la trazabilidad de los OMG introducidos al mercado, la **Reglamento (CE) 1830/2003** establece que los vendedores deberán informar a los compradores que un producto contiene OMG, etiquetando los productos con la frase “Este producto contiene OMG” e identificando los ingredientes que provengan de OMG.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Dado el creciente aumento de la población -en 1950 era de 2.600 millones de personas y en 2011 se alcanzaron los 6.000 millones-, uno de los mayores desafíos de la humanidad es satisfacer la creciente demanda de alimentos. Además, resulta necesario hacer frente a otros problemas como el cambio climático o la destrucción de las tierras que en cierta manera derivan de la producción ganadera.

Para ello, se busca combatir esta situación haciendo uso de diferentes enfoques. Uno de ellos, es la educación al consumidor, para que reduzca el desecho de alimentos o un correcto tratamiento de los residuos. No obstante, esto puede no resultar suficiente para solucionar el problema que se plantea y por ello, otro enfoque que se está empleando es el uso de ingeniería genética para crear OMG con diferentes propósitos, como reducir la contaminación producida por la ganadería, modificar el perfil nutricional de los alimentos y conservar el medioambiente.

En esta línea, los investigadores se propusieron conseguir un aumento de rendimiento de la canal en diferentes especies al inhibir la miostatina -proteína que actúa como regulador negativo del crecimiento muscular- haciendo el uso de CRISPR, ya que es la técnica que por ahora mejores resultados ha dado por su gran versatilidad y eficiencia.

Por ello, los investigadores se encuentran volcados con esta tecnología y el estudio de las posibles aplicaciones que pueda brindar en el futuro. No obstante, a pesar de tratarse de una tecnología que da resultados satisfactorios, el consumidor general muestra cierta reticencia al consumo de productos modificados genéticamente o que procedan de OMG, por lo que cada país ha desarrollado una legislación diferente para acercarse a esta cuestión.

El **objetivo principal** consiste en valorar el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética CRISPR/Cas para producir animales modificados genéticamente que presenten el fenotipo de doble musculación al inhibir la acción de la miostatina.

Los objetivos específicos son tres:

- Comprender qué es y cómo funciona la técnica CRISPR/Cas.
- Valorar las posibilidades que CRISPR/Cas ofrece para la inhibición de la miostatina.
- Valorar las repercusiones de la modificación funcional de la miostatina en especies domésticas.

4. METODOLOGÍA

Este trabajo se basa en una **revisión bibliográfica** de artículos publicados acerca de la tecnología de ingeniería genética CRISPR, así como su utilización en lo relativo al incremento de la masa muscular mediante la inhibición de la miostatina en diferentes especies domésticas.

Dicha búsqueda de información se ha llevado a cabo empleando distintos buscadores científicos online (*Pubmed, Google Scholar, Research Gate...*). Para aquellos, artículos para los que el acceso estaba restringido, se obtuvo acceso por medio de *Alcorze* de la Universidad de Zaragoza. También se han empleado artículos que los tutores del TFG han proporcionado.

Para ello, se han empleado **palabras clave** que facilitasen la búsqueda sistemática de información como “genetic engineering”, “CRISPR/Cas”, “Cas-9”, “myostatin”, “doble muscling” “CRISPR/Cas applications”...

Por último, para las referencias y citas bibliográficas se ha empleado el gestor de referencias bibliográficas *Mendeley*. El estilo de referencia bibliográfica empleado es el estilo Harvard.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Origen de los sistemas CRISPR

El acrónimo inglés CRISPR se refiere a “Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”, en español “repeticiones palindrómicas cortas agrupadas e interespaciadas regularmente”. Además, también están las proteínas “Cas” (CRISPR-associated (Cas) proteins) que son endonucleasas esenciales asociadas al sistema CRISPR (Mojica et al, 2016).

Durante los últimos 30 años, se han empleado diversas técnicas para la ingeniería genética, pero el hecho de que el gen se acoplase de forma aleatoria en el genoma generaba problemas no deseados. El uso de células madre embrionarias (ESC) permitió paliar en cierta medida el problema, pero su uso se encontraba limitado a roedores (Capecchi et al, 2005). Por ello, se

comenzaron a estudiar métodos más eficientes para modificar el genoma animal, y en esto los procariotas demostraron ser realmente útiles.

La existencia del sistema CRISPR empezó a ponerse en evidencia a finales de la década de los 80 en bacterias Gram-negativas, cuando los equipos de Yoshizumi Ishino y Atsuo Nakata, observaron secuencias repetidas de 29 nucleótidos en el genoma de *E. coli* (Figura 6). Estas secuencias se agrupaban junto los genes *iap*, que codifican isozimas, las cuales están implicadas en la conversión de la fosfatasa alcalina (Ishino et al, 1987; Nakata et al. 1989).

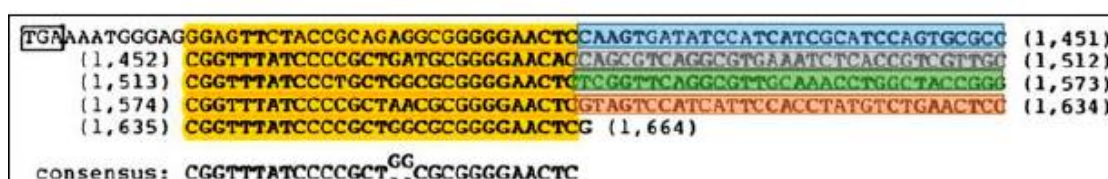


Figura 6. Agrupación CRISPR en genoma de *E. coli* (se presenta en color amarillo). Las repeticiones de secuencias se encuentran separadas por los spacers (color azul y verde). (Imagen extraída de Ishino et al, 1987)

En 1991, se identificaron repeticiones directas interespaciadas (DR) en *Mycobacterium tuberculosis complex* (Hermans et al, 1991). Dichos DR, conocidos como espaciadores, se siguen empleando hoy en día utilizados como marcadores genéticos. En 1995, Francisco J.M.

Mojica, describe este tipo de secuencias en el género *Haloferax* (Mojica et al., 1995). Posteriormente, entre 1996 y el año 2000, Mojica y otros laboratorios hallaron elementos similares en otras archaea y bacterias (Mojica et al. 2000). En este trabajo, Francisco J.M Mojica y su equipo descubrieron que estas familias CRISPR estaban muy extendidas en los procariotas. Se crearon bases de datos de ADN para designar un nuevo tipo de repeticiones espaciadas regularmente (SRSR, denominación que recibieron inicialmente), siendo en 2002, cuando un grupo de microbiólogos en Holanda propusieron al equipo de Francisco J.M Mojica unificar la diversidad de denominaciones para estos elementos de ADN repetidos bajo el acrónimo CRISPR (Mojica et al, 2016).

Hasta 2005 no se tuvo constancia de la función que estaba asociada, cuando las sospechas comenzaron al observar la relación entre CRISPR y la resistencia a la infección por virus (Mojica et al., 2005). La similitud de algunos espaciadores y secuencias de ADN de bacteriófagos o plásmidos (las bacterias que portaban dichas matrices CRISPR eran resistentes a los bacteriófagos que tenían la misma secuencia) y la confirmación por parte de numerosos laboratorios reafirmó la posible relación entre CRISPR y los mecanismos de defensa

bacterianos, siendo en 2007 cuando se demostró de forma experimental (Barrangou et al, 2007). Estos descubrimientos permitieron definir al sistema CRISPR-Cas como una barrera genética de inmunidad adaptativa en los procariotas.

En 2011 se descubrió la existencia en sistemas concretos, de una molécula de ARN adicional que era necesaria para generar moléculas de crRNA maduras. Además, también se comenzaron a definir numerosos sistemas CRISPR-Cas en *archaea* y *bacteria*. Con dicha información, se trató de clasificar (Figura 7) desde un punto de vista evolutivo, función y estructura (Makarova et al, 2011) dando lugar a:

- **Clase I:** Requieren de un complejo multiproteico para el reconocimiento del objetivo y la escisión. Dicha clase se encuentra formada por los tipos I, III, IV.
- **Clase II:** Únicamente requiere de una proteína Cas, produciendo cortes únicos de ADN. Dicha clase se encuentra formada por los tipos II, V y VI.

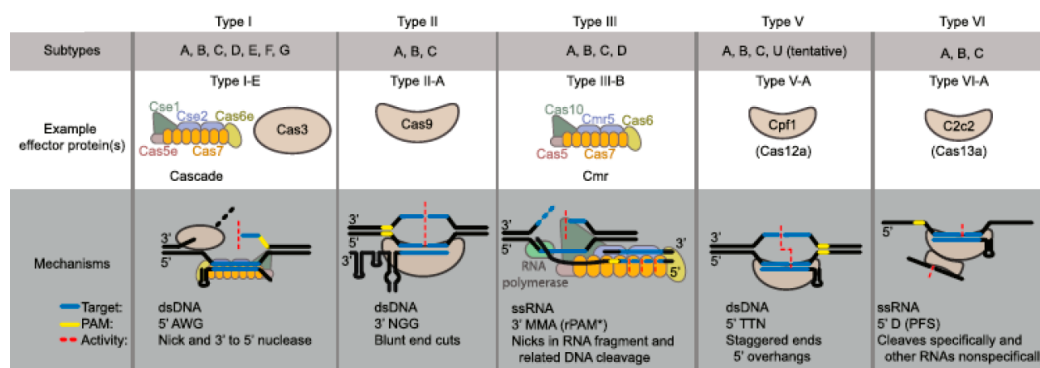


Figura 7. Tipos de sistemas CRISPR junto a las proteínas Cas que les están asociadas.

(Imagen extraída de Fagen et al, 2017)

No sería hasta el verano de 2012 cuando se definieron las propiedades de sistemas CRISPR-Cas reconstituidos in vitro, sugiriendo que se podrían emplear en edición genética. A raíz de esto, diversos laboratorios experimentarían obteniendo resultados similares, ayudando a comprender la importancia de los complejos crRNA y Cas9 para dirigir en secuencias de ADN objetivo del crRNA (Mojica et al, 2016).

Pasarían pocos meses hasta que laboratorios independientes confirmasen el éxito al modificar el genoma de bacterias y mamíferos (humanos y ratones), incluyendo células pluripotenciales. En 2013, se demostró la versatilidad del CRISPR-Cas9 para modificar diversas mutaciones en distintos genes con un único paso, así como editando varios genes a la vez (Cong et al, 2013).

El sistema CRISPR ha demostrado su gran versatilidad en diferentes ámbitos de la edición genética y se espera una gran contribución en diferentes campos como:

- Ingeniería genética de plantas y animales para la agricultura y ganadería, mejorando rendimientos productivos.
- Desarrollo de investigación de los mecanismos moleculares e implicación de los genes en el fenotipo y en el desarrollo de enfermedades como el cáncer, al poder emplear especies de abasto similares en tamaño y fisiología, como biomodelos.
- Mejora de la salud animal y protección del medioambiente.

5.2. Fundamentos de CRISPR

Como ya se ha mencionado, el origen del CRISPR tiene lugar en el sistema inmune de los procariotas, un sistema de inmunidad adquirida donde fragmentos de ADN extraño se incorporan al genoma y sirven como mecanismo de memoria ante exposiciones pasadas. Los fragmentos de ADN incorporados son empleados como ARNs, que se emplearán por el sistema para la degradación de ácidos nucleicos extraños.

El tipo II (procedente de *Streptococcus pyogenes*) que tan solo requiere la actividad de una única proteína, es el elegido de forma mayoritaria para la edición genética de animales de abasto (Mojica et al, 2016).

El sistema adaptado para la edición genética consta de:

- **Proteína Cas9** (Nucleasa asociada al CRISPR): es una proteína multidominio de tipo II que cataliza DSBs en el ADN objetivo en guiado por el crRNA en asociación con tracrRNA.
- **sgRNA**: encargado de dirigir al Cas9 al lugar objetivo, el cual está compuesto por 20 nucleótidos seguidos por NGG (“N” se refiere a cualquier base nitrogenada seguida por dos guaninas)

CRISPR es capaz de reconocer una secuencia específica de ADN a lo largo del genoma e inducir una rotura de la doble cadena de ADN en ese locus por la acción de dos dominios de la nucleasa (Figura 8). La rotura de ADN no genera por sí misma la mutación, pero las células eucariotas tienden a reparar dichas roturas por la unión de extremos no homólogos (NHEJ), lo cual genera mutaciones por la inserción o delección de bases (esto se conoce como “indels”) durante el proceso de reparación.

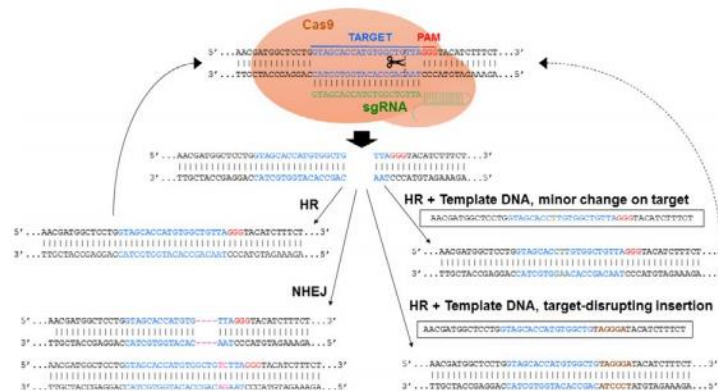


Figura 8. Generación de KO o KI por mecanismos de reparación endógenos una vez el CRISPR ha producido el DSB en la diana. En el caso de que la diana de CRISPR sea reconstituida por recombinación homóloga (HR), Cas9-sgRNA reconoce el objetivo generando nuevamente un corte que puede repararse mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ). (Imagen extraída de Lamas Toranzo et al, 2017)

El

generar indels es particularmente útil para desarrollar el knockout. Si el objetivo de CRISPR se encuentra localizado en el marco de lectura (ORF) de un gen concreto, el indel podría interrumpir el ORF si no es múltiplo de 3. Es decir, CRISPR nos da la posibilidad de generar modelos KO con gran eficiencia y en un único paso (pudiendo ser aplicados directamente a los cigotos sin tener que emplear intermediarios como ESCs o fibroblastos).

La rotura de la cadena de ADN puede repararse por HR, lo cual podría reconstruir la secuencia o en el caso de usar una plantilla, insertar una secuencia específica, generando un knockin (KI). La mejora de la eficiencia de la HR al combinarla con endonucleasas sitio específicas significa grandes avances para la generación de KI. En el caso del uso de CRISPR para la generación de modelos KI, la inserción debe interrumpir la secuencia objetivo o CRISPR continuará generando DSB que darán lugar a un indel o inserciones múltiples en el lugar objetivo (Lamas et al, 2017).

5.3. CRISPR y modificación de la miostatina (MSTN)

Los resultados de la búsqueda de información sobre la aplicación de la tecnología CRISPR en la modificación de la miostatina se resume en la tabla que figura como anexo (Tabla 1 del anexo I). En dicha tabla se recopila la información acerca de distintos estudios, reuniendo la información en función de los siguientes apartados: especie y estirpe, material biológico utilizado (células, cigotos...), editor o tipo de herramienta CRISPR empleada, método de introducción (IPN/SCNT), tipo de modificación planificada (KO o KD: knock down), fenotipo obtenido, problemas resultantes y la referencia de cada estudio.

Lo primero que conviene destacar es la gran relevancia que ha adquirido el CRISPR en la modificación de la MSTN desde su despegue en 2015, dejando relegadas a un segundo plano al resto de endonucleasas.

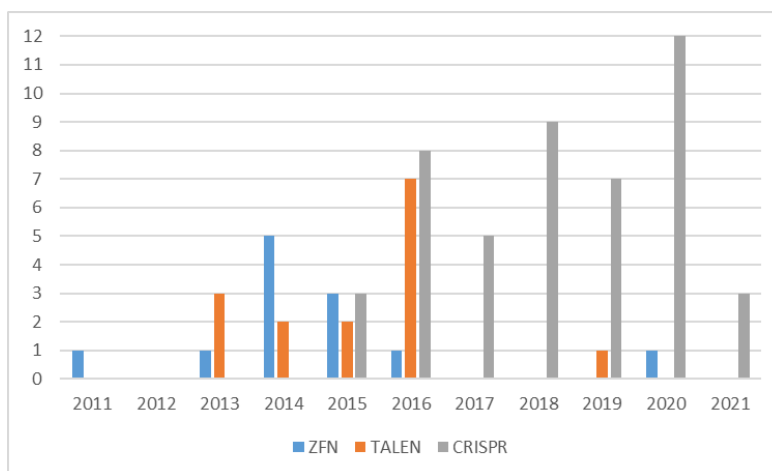


Figura 9. Representación gráfica del número de estudios realizados con cada una de las endonucleasas y el año en el que fueron realizados. La primera que comenzó a ser empleada fueron los ZFNs, que perdieron relevancia al comenzar a usar los TALEN. Una vez se comenzó a usar el CRISPR sobre 2015, ambas endonucleasas quedaron relegadas en un segundo plano.

Otro aspecto relevante es la diversidad de especies de vertebrados (mamíferos, aves y peces) en las que ha sido utilizado. Incluso fue empleada para modificar MSTN en un invertebrado como la ostra (Yu et al. 2019). Aunque teóricamente tanto ZFN como TALEN podrían utilizarse en cualquier especie, en la práctica, la simplicidad de diseño y obtención de RNAs guía de CRISPR, facilita enormemente su aplicación. Es muy significativo el empleo de CRISPR en aves, organismos en los que ha sido especialmente complicada la aplicación de métodos de ingeniería genética debido a su reproducción y la estructura del huevo cleidótico. La transfección y trasplante de células germinales primordiales (PGCs) modificadas (Kim et al. 2020), o la infección del blastodermo con adenovirus (Lee et al. 2020), aparecen como rutas practicable para abordar la modificación genética en aves mediante CRISPR.

En lo que respecta a los editores utilizados, lo más empleado ha sido el uso de CRISPR para producir indels mediante recombinación no homóloga, es decir, utilizando Cas9 y un gRNA guía que permitan introducir cortes bicatenarios, estimulando los mecanismos de reparación del ADN y cuya consecuencia es la producción de inserciones y deleciones de longitud variable. En unos pocos casos se ha hecho uso de mecanismos de reparación dirigida por homología, bien utilizando ssODN, para modificaciones mediante la introducción de un molde con la mutación

ya definida (Wang et al. 2016), mediante Knock-In en el locus MSTN (Zhang et al. 2018) o la introducción de sitios LoxP de reconocimiento de la recombinasa Cre en proyectos de mutagénesis condicional (Bi et al 2016). El uso de editores de base no ha sido frecuente, aunque consta un estudio realizado por este procedimiento y que puede ser útil en la modificación precisa de MSTN (Wang et al., 2020).

La modificación de MSTN, dada la conservación de su estructura génica en los vertebrados, ha sido de forma mayoritaria en dos regiones: bien en el exón 1, mediante indels que provocan transiciones del marco de lectura dando lugar a codones “stop” prematuros, o bien en el tercer exón alterando la parte funcional de la proteína.

Para la producción de los animales modificados en MSTN, básicamente se emplean dos sistemas (Figura 10). El primero se basa en la microinyección directa en cigotos, de utilización mayoritaria en mamíferos y peces (23/49 trabajos han hecho uso de este método). El segundo consiste en la modificación de células, por lo general fibroblastos fetales de la especie en cuestión y una vez analizadas y seleccionado los clones con la modificación planificada, se transfiere el material genético a ovocitos enucleados, mediante transferencia nuclear de células somáticas (SCNT). Este procedimiento ha tenido un uso mayoritario en el cerdo, pero también se ha optado por este método en el proyecto que se está llevando a cabo en équidos y en algunos proyectos en rumiantes, sobre todo en la cabra, aunque también hay ejemplos en oveja y vaca. En 12 de 49 trabajos han empleado SCNT, a pesar de ser más costoso, porque resulta más preciso, ya que la selección previa de las células cultivadas facilita establecer el cambio genético que se desea introducir en la especie. Otros métodos empleados son la electroporación (4/49), uso de virus como lentivirus o adenovirus (3/49), mutación natural (O’Hara et al, 2021) y transfección (Wang et al, 2017).

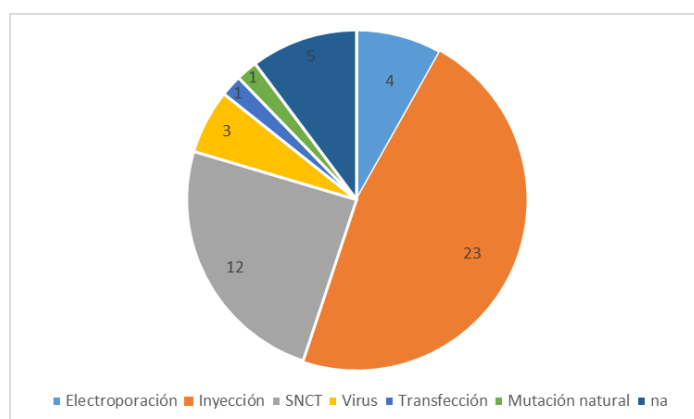


Figura 10. Representación gráfica del número de estudios realizados con cada método.

Dichas modificaciones realizadas en la MSTN, se reflejaron en los fenotipos de los animales obtenidos, aunque hubo un pequeño número de estudios que no mencionan los cambios fenotípicos obtenidos o que no son aplicables por el tipo de estudio realizado. Como era de esperar, y como se ha comentado anteriormente en el trabajo, las modificaciones genéticas realizadas se plasmaron de diversas formas, en la masa muscular (hipertrofia e hiperplasia, aumento del número de fibras musculares, síntesis de factores miogénicos como MyoD, mayor proliferación y diferenciación muscular), y en determinados casos en una reducción de la deposición grasa dando lugar a animales con mejor conformación, mayor peso (en algunos casos un 30%) y por ende, un mejor rendimiento de la canal.

No obstante, las técnicas de ingeniería genética, incluido el CRISPR, no están exentos de problemas. Ciertamente, que la posibilidad de seleccionar el sitio específico a modificar que nos brinda el CRISPR, permite reducir la tasa de aparición de efectos secundarios o indeseados con respecto a otras técnicas de ingeniería genética. En este caso, dentro de los 48 estudios realizados aparecieron diversos efectos secundarios (en 19 de los 48 estudios), aunque en la mayoría de ellos no se han producido efectos secundarios o no se mencionan. Dentro de los resultados indeseados, los más comunes son los relacionados con el metabolismo (mayor ácido úrico, más fosfatasa alcalina, menor bilirrubina, cambios en el metabolismo de los lípidos, respiración mitocondrial reducida que genera fatiga por descenso de ATP...), con abortos o muertes de neonatos, o con deformidades anatómicas (aumento del tamaño de la lengua, dislocaciones dentales, deformidad espinal, aumento del peso cardíaco, anomalías en extremidades).

Por último, algo muy notable, es la ausencia de investigadores europeos y la presencia prácticamente exclusiva de investigadores y centros chinos entre los estudios de CRISPR y miostatina. La regulación europea no está ayudando precisamente a facilitar los proyectos de edición de genomas con fines comerciales, puesto que en julio de 2018 el Tribunal de Justicia de la UE determinó que los organismos mejorados mediante edición genética debían regularse bajo la Directiva Europea 2001/18/EC (con la que se legisla en la actualidad a los organismos transgénicos), suscitando un gran debate entre la comunidad científica, ya que en su momento dificultó la investigación científica y retrasó el emprendimiento en el sector agrobiotecnológico, al estar sujeto a un largo y carísimo proceso regulador. Además, fuera de Europa, muchos otros países (China, EEUU, Australia, Corea del Sur, Japón...) se han posicionado de forma menos restrictiva en cuanto a la regulación de CRISPR, dando una gran ventaja en el desarrollo y aplicación de una prometedora tecnología como es CRISPR (Montoliu. L, 2018; Pio. J, 2021)

Por otro lado, el incierto panorama en relación a la propiedad de patentes y la lucha desatada por su control tampoco está favoreciendo el uso de estas herramientas por la industria y su empleo fuera de los ámbitos académicos (Sherkow, 2018).

6. CONCLUSIONES

1. La miostatina es una proteína que regula negativamente el crecimiento muscular y su inhibición tiene un gran interés comercial en el sector agrobiotecnológico. La pérdida funcional, total o parcial, es la causa del fenotipo de doble musculación en distintas especies, pero también puede conllevar diversos problemas, como urolitiasis, distocias, mayor fatiga, afectación del metabolismo lipídico y malformaciones, dependiendo de la especie o raza utilizada.
2. Existen diversas técnicas de ingeniería genética: inyección pronuclear, transferencia nuclear, que junto a herramientas de edición genética mediante endonucleasas (ZFNs, TALENs, Meganucleasas, CRISPR), han podido utilizarse en modelos animales para modificar la expresión de la miostatina.
3. El sistema CRISPR, además de ser un sistema de inmunidad adaptativa en bacterias, es con diferencia la herramienta de edición genómica de elección por su versatilidad y simplicidad de diseño y producción. La revisión de los proyectos de inhibición de miostatina llevados a cabo en los últimos años, indican que CRISPR ha sustituido por completo al resto de herramientas de edición genómica.
4. En la Unión Europea existe legislación específica acerca de los OMG, que considera los animales modificados mediante CRISPR como animales transgénicos sometidos a la misma regulación restrictiva, suscitando un gran debate en la comunidad científica. Unido al problema de la lucha legal en curso por la propiedad de patentes sobre CRISPR, se advierte del peligro para Europa de quedar rezagada en este campo tan importante de la biotecnología animal.

6.1. CONCLUSIONS

1. Myostatin is a protein that negatively regulates muscle growth and its inhibition is of great commercial interest in the agro-biotechnology sector. Total or partial functional loss is the cause of the double-muscle-building phenotype in different species, but it can also lead to various problems, such as urolithiasis, dystocia, increased fatigue, lipid metabolism impairment or malformations, depending on the species or breed used.

2. There are various genetic engineering techniques: pronuclear injection, nuclear transfer, which together with gene editing tools using endonucleases (ZFNs, TALENs, Meganucleases, CRISPR), have been used in animal models to modify myostatin expression.
3. The CRISPR system, in addition to being an adaptive immunity system in bacteria, is by far the genomic editing tool of choice due to its versatility and simplicity of design and production. The review of the myostatin inhibition projects carried out in recent years indicates that CRISPR has completely replaced the rest of genomic editing tools.
4. In the European Union there is specific legislation on GMOs, which considers animals modified by CRISPR as transgenic animals subject to the same restrictive regulation, causing a great debate in the scientific community. Coupled with the problem of the ongoing legal fight for patent ownership of CRISPR, it warns of the danger for Europe of being left behind in this important field of animal biotechnology.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Desde mi perspectiva, considero que es esencial continuar con la investigación sobre el funcionamiento del CRISPR y sus posibles aplicaciones, para buscar soluciones a la contaminación, destrucción de tierras y el abastecimiento de toda la población con productos suficientes y nutritivos que dejen satisfechas sus necesidades.

En lo respectivo al CRISPR, como ya se ha comentado en diversas ocasiones a lo largo del trabajo, lo más destacable es su gran utilidad, eficiencia y versatilidad para diversos campos de actuación y en este caso, la inhibición de la miostatina. No obstante, para continuar haciendo uso de técnicas de ingeniería genética para la producción de OMG, considero que es necesaria una educación básica al consumidor sobre éstos, ya que todavía existe rechazo al consumo de OMG o productos elaborados con ellos.

Desde un enfoque académico, ha sido un reto comprender los fundamentos de un campo tan amplio como es la ingeniería genética y en concreto de la técnica CRISPR -que era algo completamente nuevo para mí-, así como del funcionamiento fisiológico de la miostatina de una manera más profunda.

Para finalizar, agradecer la labor como tutores de Pedro Muniesa y María Climent, por sus conocimientos y explicaciones aportadas acerca de una materia que era desconocida para mí.

Por último, agradecer también a mi familia y amigos por haber sido un gran apoyo durante estos cinco maravillosos años del Grado de Veterinaria.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Aiello, D., Patel, K. and Lasagna, E. (2018) 'The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals', *Animal Genetics*, 49(6), pp. 1–37. doi: <https://doi.org/10.1111/age.12696>.
2. Martínez, A. et al. (2010) 'Effect of breed body size and the muscular hypertrophy gene in the production and carcass traits of concentrate-finished yearling bulls', *Journal of Animal Science*, 88(4), pp. 1229–1239. doi: 10.2527/jas.2009-2025.
3. Barrangou, R. et al. (2007) 'CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes', *Science*, 315(5819), pp. 1709–1712. doi: 10.1126/science.1138140.
4. Bi, Y. et al. (2016) 'Isozygous and selectable marker-free MSTN knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP', *Scientific Reports*, 6. doi: 10.1038/srep31729.
5. Bleck, G. T. et al. (1998) 'Production of bovine alpha-lactalbumin in the milk of transgenic pigs', *Journal of Animal Science*, 76(12), p. 3072. doi: 10.2527/1998.76123072x.
6. Boch, J. and Bonas, U. (2010) 'Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: Discovery and function', *Annual Review of Phytopathology*, 48, pp. 419–436. doi: 10.1146/annurev-phyto-080508-081936.
7. Bradley, A. et al. (1984) 'Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines', *Nature*, 309(5965), pp. 255–256. doi: 10.1038/309255a0.
8. Breitbart, A. et al. (2011) 'Myostatin from the heart: Local and systemic actions in cardiac failure and muscle wasting', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 300(6). doi: 10.1152/ajpheart.00200.2011.
9. Capecchi, M. R. (2005) Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat. Rev. Genet.* 6(6):507–12. Available at: www.nature.com/reviews/genetics (Accessed: 4 May 2021).
10. Cong, L. et al. (2013) 'Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems', *Science*, 339(6121), pp. 819–823. doi: 10.1126/science.1231143.
11. Christian, M. et al. (2010) 'Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases', *Genetics*, 186(2), pp. 756–761. doi: 10.1534/genetics.110.120717.
12. Crispo, M. et al. (2015) 'Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes', *PLoS ONE*, 10(8). doi: 10.1371/journal.pone.0136690.
13. Dingwei, P. et al. (2021) 'Editing the cystine knot motif of MSTN enhances muscle development of Liang Guang Small Spotted pigs', *Yi chuan = Hereditas*, 43(3), pp. 261–270. doi: 10.16288/j.ycz.20-222.

14. Directiva 2011/18/Ce, de 12 de marzo, sobre la liberación intencional en el medioambiente de organismos modificados genéticamente por la que se deroga la Directiva 90/220/CEE del consejo. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, de 17 núm L 106/1 de 17 de abril de 2001, pp. 1-39.
15. Directiva (UE) 2015/412, de 11 de marzo, sobre la posibilidad de que los Estados miembros restrinjan o prohíban el cultivo de organismos modificados genéticamente (OMG) en su territorio. Diario Oficial de la Unión Europea, núm L 68/1, de 13 de marzo de 2015, pp. 1-8
16. Du, S. J. et al. (1992) 'Growth enhancement in transgenic atlantic salmon by the use of an "All Fish" chimeric growth hormone gene construct', *Bio/Technology*, 10(2), p. 176. doi: 10.1038/nbt0292-176.
17. España. Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente. Boletín Oficial del Estado, 26 de abril de 2003, núm. 100, pp. 16214-16223.
18. Evans, M. J. and Kaufman, M. H. (1981) 'Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos', *Nature*, 292(5819), pp. 154-156. doi: 10.1038/292154a0.
19. Fagen, J. R. et al. (2017) 'Advancing the design and delivery of CRISPR antimicrobials', *Current Opinion in Biomedical Engineering*. Elsevier B.V., pp. 57-64. doi: 10.1016/j.cobme.2017.10.001.
20. Gadea, J. and García-Vázquez, F. (2010) Métodos de generación de cerdos transgénicos. ITEA, Vol. 106 (1), 15-29. Available at: <http://www.um.es/grupo-fisiovet> (Accessed: 29 March 2021).
21. Ge, L. et al. (2020) 'Mutation in myostatin 3'UTR promotes C2C12 myoblast proliferation and differentiation by blocking the translation of MSTN', *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, pp. 634-643. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.043.
22. Ge, L. et al. (2021) 'Myostatin site-directed mutation and simultaneous PPAR γ site-directed knockin in bovine genome', *Journal of Cellular Physiology*, 236(4), pp. 2592-2605. doi: 10.1002/jcp.30017.
23. Generalidades de la Ganadería Bovina.: Belgian Blue (Blanco Azul Belga). (2014). Available at: <http://generalidadesdelaganaderiabovina.blogspot.com/2014/01/belgian-blue-blanco-azul-belga.html> (Accessed: 3 February 2021).
24. Golovan, S. P. et al. (2001) 'Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure', *Nature Biotechnology*, 19(8), pp. 741-745. doi: 10.1038/90788.
25. Grobet, L. et al. (1997) 'A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle', *Nature Genetics*, 17(1), pp. 71-74. doi: 10.1038/ng0997-71.
26. Guo, R. et al. (2016) 'Generation and evaluation of Myostatin knock-out rabbits and goats using CRISPR/Cas9 system',

- Scientific Reports, 6. doi: 10.1038/srep29855.
27. Gupta, D. et al. (2019) 'CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing', Life Sciences. Elsevier Inc. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116636.
 28. Hammer, R. E. et al. (1985) 'Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection', Nature, 315(6021), pp. 680–683. doi: 10.1038/315680a0.
 29. Han, Y. Q. et al. (2018) 'Myostatin knockout induces apoptosis in human cervical cancer cells via elevated reactive oxygen species generation', Redox Biology, 19, pp. 412–428. doi: 10.1016/j.redox.2018.09.009.
 30. He, Z. et al. (2018) 'Use of CRISPR/Cas9 technology efficiently targetted goat myostatin through zygotes microinjection resulting in double-muscléd phenotype in goats', Bioscience Reports, 38(6). doi: 10.1042/BSR20180742.
 31. Hermans, P. W. M. et al. (1991) 'Insertion element IS987 from Mycobacterium bovis BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in Mycobacterium tuberculosis complex strains', Infection and Immunity, 59(8), pp. 2695–2705. doi: 10.1128/iai.59.8.2695-2705.1991.
 32. Hirata, M. et al. (2019) 'Genome mutation after introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system in matured oocytes and putative zygotes', In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal, 55(4), pp. 237–242. doi: 10.1007/s11626-019-00338-3.
 33. Holmes, J. H., Ashmore, C. R. and Robinson, D. W. (1973) 'Effects of stress on cattle with hereditary muscular hypertrophy.', Journal of animal science, 36(4), pp. 684–694. doi: 10.2527/jas1973.364684x.
 34. Huang, P. et al. (2019) 'The possible role of complete loss of myostatin in limiting excessive proliferation of muscle cells (C2C12) via activation of microRNAs', International Journal of Molecular Sciences, 20(3). doi: 10.3390/ijms20030643.
 35. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. (1987) Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. J. Bacteriol. Volume 169; pp. 5429–5433.
 36. Javed, A. et al. (2012) 'Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of β -lactoglobulin-free, high-casein milk', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(42), pp. 16811–16816. doi: 10.1073/pnas.1210057109.
 37. Jacquier, A. and Dujon, B. (1985) 'An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene', Cell, 41(2), pp. 383–394. doi: 10.1016/S0092-8674(85)80011-8.
 38. Kambadur, R. et al. (1997) 'Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscléd Belgian Blue and Piedmontese cattle', Genome Research, 7(9), pp. 910–916. doi: 10.1101/gr.7.9.910.
 39. Kathiria, P. and Eudes, F. (2014) 'Nucleases for genome editing in crops', Biocatalysis

- and Agricultural Biotechnology, pp. 14–19. doi: 10.1016/j.bcab.2013.12.006.
40. Khalil, K. et al. (2017) 'Generation of Myostatin Gene-Edited Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) via Zygote Injection of CRISPR/Cas9 System', *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-07223-7.
 41. Kim, Y. G., Cha, J. and Chandrasegaran, S. (1996) 'Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusions to Fok I cleavage domain', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(3), pp. 1156–1160. doi: 10.1073/pnas.93.3.1156.
 42. Kim, Y. G. et al. (1997) 'Site-specific cleavage of DNA-RNA hybrids by zinc finger/FokI cleavage domain fusions', *Gene*, 203(1), pp. 43–49. doi: 10.1016/S0378-1119(97)00489-7.
 43. Kim, G. D. et al. (2020) 'Generation of myostatin-knockout chickens mediated by D10A-Cas9 nickase', *FASEB Journal*, 34(4), pp. 5688–5696. doi: 10.1096/fj.201903035R.
 44. Kolb, A. et al. (2001) A Virus-Neutralising Monoclonal Antibody Expressed in the Milk of Transgenic Mice.
 45. Kuroiwa, Y. et al. (2004) 'Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin- μ and prion protein in cattle', *Nature Genetics*, 36(7), pp. 775–780. doi: 10.1038/ng1373.
 46. Lamas-Toranzo, I. et al. (2017) 'CRISPR is knocking on barn door', *Reproduction in Domestic Animals*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 39–47. doi: 10.1111/rda.13047.
 47. Lamas-Toranzo, I. et al. (2017) 'CRISPR is knocking on barn door', *Reproduction in Domestic Animals*. Blackwell Publishing Ltd, pp. 39–47. doi: 10.1111/rda.13047.
 48. Lanigan, T. M., Kopera, H. C. and Saunders, T. L. (2020) 'Principles of genetic engineering', *Genes*. MDPI AG. pp. 1–21. doi: 10.3390/genes11030291.
 49. La Presidencia, M. DE and Con Las Cortes Igualdad, R. E. (2019) MINISTERIO DE LA PRESIDENCIA, RELACIONES CON LAS CORTES E IGUALDAD. Available at: <http://www.boe.es> (Accessed: 1 April 2021).
 50. Le, Q. A. et al. (2020) 'Effects of electroporation treatment using different concentrations of Cas9 protein with gRNA targeting Myostatin (MSTN) genes on the development and gene editing of porcine zygotes', *Animal Science Journal*, 91(1). doi: 10.1111/asj.13386.
 51. Lee, J., Kim, D. H. and Lee, K. (2020) 'Muscle hyperplasia in Japanese quail by single amino acid deletion in MSTN propeptide', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4). doi: 10.3390/ijms21041504.
 52. Li, C. et al. (2018) 'Trio-based deep sequencing reveals a low incidence of off-target mutations in the offspring of genetically edited goats', *Frontiers in Genetics*, 9(OCT), p. 449. doi: 10.3389/fgene.2018.00449.
 53. Li, J. et al. (2019) 'Inefficient ATP synthesis by inhibiting mitochondrial respiration causes lipids to decrease in MSTN-lacking muscles of loach *Misgurnus anguillicaudatus*', *Functional and Integrative Genomics*, 19(6), pp. 889–900. doi: 10.1007/s10142-019-00688-x.
 54. Li, R. et al. (2020) 'Precise editing of myostatin signal peptide by CRISPR/Cas9

- increases the muscle mass of Liang Guang Small Spotted pigs', *Transgenic Research*, 29(1), pp. 149–163. doi: 10.1007/s11248-020-00188-w.
55. Lillico, S. G. *et al.* (2016) 'Mammalian interspecies substitution of immune modulatory alleles by genome editing', *Scientific Reports*, 6. doi: 10.1038/srep21645.
 56. Lv, Q. *et al.* (2016) 'Efficient Generation of Myostatin Gene Mutated Rabbit by CRISPR/Cas9', *Scientific Reports*, 6. doi: 10.1038/srep25029.
 57. Makarova, K. S. *et al.* (2011) 'Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems', *Nature Reviews Microbiology*, pp. 467–477. doi: 10.1038/nrmicro2577.
 58. Martello, G. and Smith, A. (2014) 'The Nature of Embryonic Stem Cells', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, pp. 647–675. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013116.
 59. Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78(12):7634–38.
 60. McPherron, A. C., Lawler, A. M. and Lee, S. J. (1997) 'Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member', *Nature*, 387(6628), pp. 83–90. doi: 10.1038/387083a0.
 61. Mojica, F. J. M. *et al.* (1995) 'Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning', *Molecular Microbiology*, 17(1), pp. 85–93. doi: 10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x.
 62. Mojica, F. J. M. *et al.* (2000) 'Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria' *Molecular Microbiology*, 36 (1), pp. 244–246. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x
 63. Mojica, F. J. M. *et al.* (2005) 'Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements', *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), pp. 174–182. doi: 10.1007/s00239-004-0046-3.
 64. Mojica, F. J. M. and Montoliu, L. (2016) 'On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals', *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 811–820.
 65. Montoliu, L (2018). "Europa vuelve a perder el tren del progreso y la innovación" *El País*, 26 de julio. Disponible en: https://elpais.com/elpais/2018/07/26/ciencia/1532600922_716551.html [Consultado 07-06-2021].
 66. Morikawa, M., Derynck, R. and Miyazono, K. (2016) 'TGF- β and the TGF- β family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: 10.1101/cshperspect.a021873.
 67. Moro, L. N. *et al.* (2020) 'Generation of myostatin edited horse embryos using CRISPR/Cas9 technology and somatic cell nuclear transfer', *Scientific Reports*, 10(1). doi: 10.1038/s41598-020-72040-4.
 68. Nakata, A., Amemura, M. and Makino, K. (1989) 'Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the Escherichia

- coli K-12 chromosome', *Journal of Bacteriology*, 171(6), pp. 3553–3556. doi: 10.1128/jb.171.6.3553-3556.1989.
69. Namula, Z. et al. (2019) 'Genome mutation after the introduction of the gene editing by electroporation of Cas9 protein (GEEP) system into bovine putative zygotes', *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 55(8), pp. 598–603. doi: 10.1007/s11626-019-00385-w.
 70. Ni, W. et al. (2014). Efficient Gene Knockout in Goats Using CRISPR/Cas9 System. Volume 9 | Issue 9 | e106718. doi:10.1371/journal.pone.0106718.g001
 71. O'Hara, V. et al. (2021) 'A highly prevalent SINE mutation in the myostatin (MSTN) gene promoter is associated with low circulating myostatin concentration in Thoroughbred racehorses', *Scientific Reports*, 11(1). doi: 10.1038/s41598-021-86783-1.
 72. Park, J. W. et al. (2020) 'Muscle differentiation induced by p53 signaling pathway-related genes in myostatin-knockout quail myoblasts', *Molecular Biology Reports*, 47(12), pp. 9531–9540. doi: 10.1007/s11033-020-05935-0.
 73. Perleberg, C., Kind, A. and Schnieke, A. (2018) 'Genetically engineered pigs as models for human disease', *DMM Disease Models and Mechanisms*, 11(1). doi: 10.1242/dmm.030783.
 74. Petersen, B. (2017) 'Basics of genome editing technology and its application in livestock species', *Reproduction in Domestic Animals*, pp. 4–13. doi: 10.1111/rda.13012.
 75. Pio, J (2021). "Regulación de la edición genética con CRISPR en la UE: no repitamos errores, nos jugamos el futuro. *El País*, 15 de abril. Disponible en: <https://elpais.com/ciencia/2021-04-15/regulacion-de-la-edicion-genetica-con-crispr-en-la-ue-no-repitamos-errores-nos-jugamos-el-futuro.html> [Consultado el 07-06-2021]
 76. Reglamento (UE) 1830/2003, de 22 de septiembre de 2003, relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos, y por el que se modifica la Directiva 2001/18/CE. Diario Oficial de la Unión Europea, núm. L 268/24, de 18 de septiembre de 2003, pp. 1-5.
 77. Saeki, K. et al. (2004) 'Functional expression of a $\Delta 12$ fatty acid desaturase gene from spinach in transgenic pigs', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(17), pp. 6361–6366. doi: 10.1073/pnas.0308111101.
 78. Sherkow, J.S. (2018). The CRISPR Patent Landscape: past, present and future. *The CRISPR Journal*, vol. 1, 1, 5-9. DOI: 10.1089/crispr.2017.0013
 79. Smith, J., Bibikova, M., Whitby, F. G., Reddy, A. R., Chandrasegaran, S., & Carroll, D. (2000). Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Research*, 28, 3361– 3369.
 80. Su, X. et al. (2018) 'Efficient genome editing in cultured cells and embryos of Debao pig and swamp buffalo using the CRISPR/Cas9 system', *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 54(5), pp. 375–383. doi: 10.1007/s11626-018-0236-8.
 81. Thompson S, Clarke AR, Pow AM, Hooper ML, Melton DW. 1989. Germ line

- transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* 56(2):313–21.
82. Wang, C. et al. (2018) 'Deletion of *mstna* and *mstnb* impairs the immune system and affects growth performance in zebrafish', *Fish and Shellfish Immunology*, 72, pp. 572–580. doi: 10.1016/j.fsi.2017.11.040.
 83. Wang, K. et al. (2015) 'Efficient Generation of Myostatin Mutations in Pigs Using the CRISPR/Cas9 System', *Scientific Reports*, 5. doi: 10.1038/srep16623.
 84. Wang, K. et al. (2016) 'Efficient Generation of Orthologous Point Mutations in Pigs via CRISPR-assisted ssODN-mediated Homology-directed Repair', *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 5(11), p. e396. doi: 10.1038/mtna.2016.101.
 85. Wang, K. et al. (2017) 'CRISPR/Cas9-mediated knockout of myostatin in Chinese indigenous Erhualian pigs', *Transgenic Research*, 26(6), pp. 799–805. doi: 10.1007/s11248-017-0044-z.
 86. Wang, L. et al. (2017a) 'Enhancing targeted genomic DNA editing in chicken cells using the CRISPR/Cas9 system', *PLoS ONE*, 12(1). doi: 10.1371/journal.pone.0169768.
 87. Wang, L. et al. (2017b) 'RNA-seq reveals transcriptome changes in goats following myostatin gene knockout', *PLoS ONE*, 12(12). doi: 10.1371/journal.pone.0187966.
 88. Wang, X. et al. (2015) 'Generation of gene-modified goats targeting *MSTN* and *FGF5* via zygote injection of CRISPR/Cas9 system', *Scientific Reports*, 5. doi: 10.1038/srep13878.
 89. Wang, X. et al. (2016a) 'Disruption of *FGF5* in cashmere goats using CRISPR/Cas9 results in more secondary hair follicles and longer fibers', *PLoS ONE*, 11(10). doi: 10.1371/journal.pone.0164640.
 90. Wang, X. et al. (2016b) 'Multiplex gene editing via CRISPR/Cas9 exhibits desirable muscle hypertrophy without detectable off-target effects in sheep', *Scientific Reports*, 6. doi: 10.1038/srep32271.
 91. Wang, X. et al. (2018a) CRISPR/Cas9-mediated *MSTN* disruption and heritable mutagenesis in goats causes increased body mass. *Animal Genetics* 49(1):43-51. doi: 10.1111/age.12626.
 92. Wang, X. et al. (2018b) 'Low incidence of SNVs and indels in trio genomes of Cas9-mediated multiplex edited sheep', *BMC Genomics*, 19(1). doi: 10.1186/s12864-018-4712-z.
 93. Wang, Yu et al. (2020) 'Cytosine Base Editor (hA3A-BE3-NG)-Mediated Multiple Gene Editing for Pyramid Breeding in Pigs', *Frontiers in Genetics*, 11. doi: 10.3389/fgene.2020.592623.
 94. Wei, Y. yan et al. (2020) 'Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in Guangdong small-ear spotted pig cells using an optimized electrotransfection method', *Biotechnology Letters*, 42(11), pp. 2091–2109. doi: 10.1007/s10529-020-02930-0.
 95. Whyte, J. J. and Prather, R. S. (2011) 'Genetic modifications of pigs for medicine and agriculture', *Molecular Reproduction and Development*, pp. 879–891. doi: 10.1002/mrd.21333.
 96. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J. & Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813.

97. Wolfman, N. M. et al. (2003) 'Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), pp. 15842–15846. doi: 10.1073/pnas.2534946100.
98. Xu, K. et al. (2020) 'Effective MSTN gene knockout by AdV-delivered CRISPR/Cas9 in postnatal chick leg muscle', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). doi: 10.3390/ijms21072584.
99. Yanagimachi, R. (2002) 'Cloning: Experience from the mouse and other animals', in *Molecular and Cellular Endocrinology*. Elsevier, pp. 241–248. doi: 10.1016/S0303-7207(01)00697-9.
100. Yeh, Y. C. et al. (2017) 'Using CRISPR/Cas9-mediated gene editing to further explore growth and trade-off effects in myostatin-mutated F4 medaka (*Oryzias latipes*)', *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-09966-9.
101. Yu, H. et al. (2019) 'Targeted Gene Disruption in Pacific Oyster Based on CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes', *Marine Biotechnology*, 21(3), pp. 301–309. doi: 10.1007/s10126-019-09885-y.
102. Yuan, H. et al. (2020) 'Regenerating Urethral Striated Muscle by CRISPRi/dCas9-KRAB-Mediated Myostatin Silencing for Obesity-Associated Stress Urinary Incontinence', *CRISPR Journal*, 3(6), pp. 562–572. doi: 10.1089/crispr.2020.0077.
103. Zhang, J. et al. (2018) 'CRISPR/Cas9-mediated specific integration of fat-1 at the goat MSTN locus', *FEBS Journal*, 285(15), pp. 2828–2839. doi: 10.1111/febs.14520.
104. Zhang, J. et al. (2019) 'Comparison of gene editing efficiencies of CRISPR/Cas9 and TALEN for generation of MSTN knock-out cashmere goats', *Theriogenology*, 132, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.03.029.
105. Zhang, T. et al. (2019) "'Double-muscling" and pelvic tilt phenomena in rabbits with the cystine-knot motif deficiency of myostatin on exon 3', *Bioscience Reports*, 39(5). doi: 10.1042/BSR20190207.
106. Zhang, Y. et al. (2018) 'CRISPR/Cas9-mediated sheep MSTN gene knockout and promote sSMCs differentiation', *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(2), pp. 1794–1806. doi: 10.1002/jcb.27474.
107. Zhong, Z. et al. (2016) 'Targeted disruption of sp7 and myostatin with CRISPR-Cas9 results in severe bone defects and more muscular cells in common carp', *Scientific Reports*, 6. doi: 10.1038/srep22953.
108. Zhu, X. X. et al. (2020) 'CRISPR/Cas9-mediated MSTN disruption accelerates the growth of Chinese Bama pigs', *Reproduction in Domestic Animals*, 55(10), pp. 1314–1327. doi: 10.1111/rda.13775.
109. Zou, Q. et al. (2015) 'Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system', *Journal of Molecular Cell Biology*. Oxford University Press, pp. 580–583. doi: 10.1093/jmcb/mjv061.

ANEXO I

TABLA I: Utilización de CRISPR en edición genómica de MSTN

	Estirpe	Biomaterial	Editor	Método	Tipo: KO/KD	Fenotipo/Contexto	Problemas	Referencia	Año	doi
Mamíferos	Ratón C3H	C2C12 mioblastos	CRISPR	na	KD traduccional	mioblasto prolif-dif-madura +	na	Ge et al.	2020	10.1016/j.ijbiomac.2020.03.043
	Ratón C3H	C2C12 mioblastos	CRISPR	Electroporacion	KO	7 miRNAs up / 28 genes down (TGFb, Fos, Rb1)	antitumoral en rabdomiosarcoma ??	Huang et al.	2019	10.3390/ijms20030643
	Rata ZUC-Lepr(fa)185-186	L6 mioblastos	CRISPRi-dCas9KRAB	Lentivirus	KD	Modelo incontinencia urinaria: mejora	nd	Yuan et al.	2020	10.1089/crispr.2020.0077
	Conejo New Zealand	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO Funcional	peso+(20-30%) (male>female)	Dislocación dental/lengua+/Pelvic tilt (fem>male)	Zhang T. et al.	2019	10.1042/BSR20190207
	Conejo nd	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	Más peso al nacimiento, mayor peso (cuadriceps y biceps)	41% lengua grande/5 nac muertos+8 Muerte posnat.	Guo et al.	2016	10.1038/srep29855
	Conejo New Zealand	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	PesoNac=/Crece+/peso+ (6wk->)/Musc+ (hipertrofia)	Lengua grande/normales y sanos	Lv et al.	2016	10.1038/srep25029
	Caprino Alpas cashmere	FF	CRISPR&TALEN	SCNT	KO	Factores miogénicos (Myf MyoD...) +	Funcion cardiaca disminuida?	Zhang J. et al.	2019	10.1016/j.theriogenology.2019.03.029
	Caprino Shaanbei Cashmere	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	Perfiles de mutaciones en tríos familiares (No varia p53)	NO hay incremento de mutagénesis	Li et al.	2018	10.3389/fgene.2018.00449
	Caprino Yangtze River Delta white	Cigotos	CRISPR	Inyección	KD funcional	peso+	metabolismo normal	He et al.	2018	10.1042/BSR20180742
	Caprino Arbas cashmere	FF	CRISPR-KI	SCNT	KO&KI simultáneo	peso+ musculo+	nd	Zhang J. et al.	2018	10.1111/febs.14520
	Caprino Shannbei cashmere	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	BW+ Músculo+ Tasa crec+	Sanos / análisis de sangre normal/CK+	Wang X. et al.	2018a	10.1111/age.12626
	Caprino Shannbei cashmere	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	RNAseq transcript-DEGs:Unsat Fatty acid metabolism+/- ?	Metabolismo lípidos	Wang L. et al.	2017b	10.1371/journal.pone.0187966
	Caprino Shannbei cashmere	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	Incremento nº folículos secundarios/mayor longitud de la fibra	normales	Wang X. et al.	2016a	10.1371/journal.pone.0164640
	Caprino nd	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	Más peso al nacimiento, mayor peso (cuadriceps y biceps)	cabras sanas	Guo et al.	2016	10.1038/srep29855
	Caprino Shannbei cashmere	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	nd	5 abortos 14 muertos al nacer	Wang X. et al.	2015	10.1038/srep13878
	Caprino nd(Cashmere?)	FF	CRISPR	SCNT	KO	nd	nd	Ni et al.	2014	10.1371/journal.pone.0106718
	Ovino nd	SEFs; sSMSCs	CRISPR	SEFs->SCNT	KO	Hiperplasia+hipertrof (sSMSCs) Fibras musc + fuertes	nd	Zhang Y. et al.	2018	10.1002/jcb.27474
	Ovino Tan	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	Secuenciación masiva y control de mutaciones (insignific.)	2.4 kb inversion en 1/54 (1,85%)	Wang X. et al.	2018b	10.1186/s12864-018-4712-z
	Ovino Tan	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	Hipertrofia miofibrillas (diámetro) BW+ ganancia peso+	Sanos	Wang X. et al.	2016b	10.1038/srep32271
	Ovino nd	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	peso nac=/peso+(day15-30-60)(20-30%) musc+/fibra diam-	nd	Crispo et al.	2015	10.1371/journal.pone.0136690
	Bovino nd	Mioblastos	CRISPR	na	KO/KI	Aumento miogénesis(KO MSTN)/adipogénesis+(KI PPARg)	nd	Ge et al.	2021	10.1002/jcp.30017
	Bovino nd	Cigotos	CRISPR	Electroporación	KO	na	na	Namula et al.	2019	10.1007/s11626- 019- 00385- w
	Bovino Swamp Buffalo (+cerdo)	FF/Cigotos	CRISPR	Inyección	???	na	na	Su et al.	2018	10.1007/s11626-018-0236-8
	Cerdo Liang Guang Small Spotted	FF	CRISPR-LPKCs	SCNT	KO Funcional	Nº miofibras incrementa	nd	Dingwei et al.	2021	10.16288/j.ycz.20-222
	Cerdo nd	FF	CRISPR-Base Editor	na	KO/KD	Ensayo editor de bases en MSTN y otros	nd	Wang Y. et al.	2020	10.3389/fgene.2020.592623
	Cerdo Bama Mini Pig	FF	CRISPR	SCNT	KO	miofibras:nº+/tamaño- // crecimiento +	nd	Zhu et al.	2020	10.1111/rda.13775
	Cerdo Landrace/Large White/Duroc	Cigotos	CRISPR	Electroporación	KO	[Cas9] -> Blastocistos no afecta	Off targets/[Cas9] indep	Le et al.	2020	10.1111/asj.13386
	Cerdo Guandong small-ear spotted	FF	CRISPR	(futuro SCNT)	KO	Condiciones electroporacion PFF	na	Wei et al	2020	10.1007/s10529-020-02930-0
	Cerdo Liang Guang Small Spotted	FF	CRISPR	SCNT	KD funcional	Musc hiperplasia+/ Miogenc factors+/PI3k-Akt+	nd	Li et al	2020	10.1007/s11248- 020- 00188- w
	Cerdo Landrace/Large White/Duroc	Ovocitos; Cigotos	CRISPR	Electroporacion	KO?	na	na	Hirata et al.	2019	10.1007/s11626-019-00338-3
	Cerdo Cerdo Debaio (+búfalo)	FF/Cigotos	CRISPR	Inyección	???	na	na	Su et al.	2018	10.1007/s11626-018-0236-8
	Cerdo Erhualian	FF	CRISPR	SCNT	KO	MSTN proteína disminuida: BW peso+(ns)	-/-normales (landrace-duroc:mort+/anomal miembros	Wang K. et al.	2017	10.1007/s11248-017-044-z
	Cerdo Large White	FF	CRISPR-ssODN HDR	SCNT	KO funcional	nd	1 recién nacido muerto	Wang K. et al.	2016	10.1038/mtna.2016.101
	Cerdo Hubei White	FF	CRISPR-Cre/LoxP	SCNT	KO	miofactors+/miofib hiperplas/musc+/grasa dorso-/peso+(12%)	Fosfatasa alcalina+/Ac urico+/bilirrubina-/LDL-(restOK	Bl et al.	2016	10.1038/srep31729
	Cerdo Landrace&Erhualian	FF	CRISPR	SCNT	KO	Musc+/ Miogenin+/myoD-/Myf5-	2 nacidos muertos/6 muertos dias 1-4/lenguas gordas	Wang K. et al.	2015	10.1038/srep16623
	Caballo Pura sangre	na	na	Mutación natural	KD	Rendimiento físico mejorado	nd	O'Hara et al.	2021	10.1038/s41598-021-86783-1
	Caballo nd	FF	CRISPR	SCNT	KO	Analisis en embriones (no adultos)	nd	Moro et al.	2020	10.1038/s41598-020-72040-4
	Perro Beagle	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	Tiangou (fem)musc+/ Hercules (masc.)musc= (germline+)	nd	Zou et al.	2015	10.1093/jmcb/miv061
	Humano na	Tumores varios	Natural/CRISPR		KO/KD	KD->proliferación -/ apoptosis+ (mitoc dep)/grasa -	lipid oxidation+ ROS+	Han et al.	2018	10.1016/j.redox.2018.09.009
Aves	Pollo Comercial nd	Intramuscular	CRISPR	Adenovirus	KO	Análisis transcriptoma (1330-600 DEGs)	nd	Xu et al	2020	10.3390/ijms21072584
	Pollo White Leghorn	Pw66 Línea PGC	CRISPR-D10ACas9nick	Lipofection-Inyección	KO	Musc hipertrof. Peso&creci + / grasa -	nd	Kim et al.	2020	10.1096/fj.201903035R
	Pollo nd	DF-1 fibroblastos	CRISPR-ssODN-RAD52	Transfección	MSTN HDR modif	na	na	Wang L. et al.	2017b	10.1371/journal.pone.0169768
	Codorniz nd	QM7 mioblastos	CRISPR	na	KO	Diferenciación muscular +	nd	Park et al.	2020	10.1007/s11033-020-05935-0
	Codorniz nd	Blastodermo	CRISPR	Adenovirus	KD?	Musc hiperplasia. Peso+ fat- (age/sex dep male>fem)	peso cardiaco + (solo en machos)	Lee et al	2020	10.3390/ijms21041504
Peces	Dojo Misgurnus anguillicaudatus	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	Musc+ / grasa muscular - (peso+ / long+)	Respiracion mitocondrial - (ATP-)	Li et al.	2019	10.1007/s10142- 019- 00688- x
	Pez cebra Danio rerio	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	solo mstnb->musc+ peso+ creci+	mortalidad (+30%), daño inmunidad (genes-/NF-kb -)	Wang C. et al.	2018	10.1016/j.fsi.2017.11.040
	Medaka Oryzias latipes	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	Longitud(10%+)/peso aumentado(65%+)/hiperplasia muscular	Deformidad espinal(12%)/peor inmunidad	Yeh et al.	2017	10.1038/s41598-017-09966-9
	Siluriformes Ictalurus Punctatus (Pez gato)	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	Hiperplasia&Hipertrofia musc /peso+30%	nd	Khalil et al	2017	10.1038/s41598-017-07223-7
	Carpa Cyprinus carpio (tetraploide)	Cigotos	TALEN&CRISPR	Inyección	KO	Musc+ /hiperplasia&hipertrofia/miofactors+	nd	Zhong et al	2016	10.1038/srep22953
Otros	Ostra Magallana(Crassostrea)gigas	Cigotos	CRISPR	Inyección	KO	nd	nd	Yu et al.	2019	10.1007/s10126-019-09885-y

FF: Fetal fibroblast

KO: Knock-Out

KI: Knock-In

KD: Knock-Down

na: no aplicable

nd: no determinado

SEFs : Sheep Ear Fibroblasts

sSMSCs:Sheep Skeletal Muscle Satellite Cells